

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

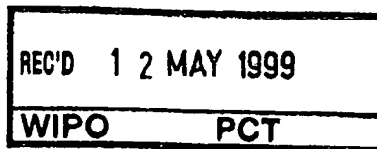
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



09/673795

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 MARS 1999

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

### PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Reservé à l'INPI**

22 AVR 1998

**SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI**

Signature (à compléter) : F. Ann 83



DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

805033

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

TITRE DE L'INVENTION : Composés peptidiques d'HSP70

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY  
39, rue Camille Desmoulins 94800 VILLEJUIF

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

TRIEBEL Frédéric  
10, rue Saint-Louis  
78000 Versailles, FR

GAUDIN Catherine  
43, avenue des Iris  
91600 Savigny-sur-Orge, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

22 avril 1998

CABINET REGIMBEAU

*[Signature]*  
F. Anus

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
6, 38			α	6.07.98	09 JUIL. 1998 - S R

La présente invention concerne des peptides ou composés peptidiques  
5 qui comportent au moins une séquence d'acides aminés homologue  
d'une partie d'HSP-70, une composition comprenant lesdits peptides et  
son utilisation pour la fabrication d'un médicament destiné en  
particulier au traitement du cancer. Dans un autre aspect, la présente  
invention porte sur les anticorps monoclonaux qui se lient à ces  
10 composés peptidiques, à leur procédé de fabrication, à leur utilisation  
dans une trousse de diagnostic et dans une composition destiné au  
traitement du cancer.

Depuis longtemps, les chercheurs ont tenté de trouver des mécanismes  
15 pour stimuler le rejet immunitaire des tumeurs en partant de  
l'hypothèse que des antigènes, pouvant servir de cibles, sont exprimés  
à la surface des cellules cancéreuses. L'équilibre délicat entre la  
croissance et la régression des tumeurs a fait l'objet de multiples  
théories, notamment en ce qui concerne le rôle du système  
20 immunitaire. L'immunosurveillance est une théorie séduisante selon  
laquelle que les tumeurs sont détruites au tout premier stade de leur  
développement par les mécanismes des défenses immunitaires. Par  
exemple, l'observation que de nombreuses tumeurs sont infiltrées par  
des cellules lymphoïdes semble être un signe de pronostique favorable.

25 Cependant, l'incidence des cancers chez des individus  
immunodéficients n'est pas significativement supérieure à la population  
générale. Ce fait a été corrélé par des expériences réalisées sur des  
souris immunodéficientes (nude mice). En effet, ces souris élevées en  
30 conditions stériles, ne développent pas plus de tumeurs que les souris  
de génotype sauvage. Ainsi, il est communément admis aujourd'hui que



le risque très légèrement accru d'apparition de cancers chez les individus immunodéficients est directement corrélé avec l'incidence des infections virales (virus oncogènes). Cela suggère que la réponse immunitaire interviendrait en limitant la dissémination de virus et en reconnaissant les cellules cancéreuses porteuses d'antigènes viraux. Lors qu'un virus oncogène intègre le génome de la cellule hôte, il y a expression par lesdites cellules de protéines modifiées qui sont susceptibles de constituer des cibles antigéniques.

Mais en ce qui concerne les tumeurs d'origine non virale, le problème majeur pour les défenses immunitaires provient du fait qu'ils n'existent pas de flagrantes différences antigéniques avec les cellules normales. C'est pourquoi ces tumeurs échapperaient dans une certaine mesure à l'immunosurveillance. Certains antigènes spécifiquement exprimés par des tumeurs non virales ont été mis en évidence. Par exemple, la protéine CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen), normalement exprimée dans les cellules hématopoïétique et réprimée dans les lymphocytes B matures normaux, se retrouve surexprimée dans les lymphoblastes. Donc, les protéines antigéniques des tumeurs ne sont pas étrangères à l'organisme et sont naturellement présentes dans certaines cellules normales.

Ainsi, ce qui distingue les protéines antigéniques, et ce qui est susceptible d'être reconnu par les défenses immunitaires, est une mutation ou une distribution différentielle ou encore une surexpression. Il est clair que la reconnaissance desdites protéines par les lymphocytes est réduite du fait de leur présence intrinsèque dans les cellules normales (sélection clonale négative). L'homme du métier doit donc résoudre ce problème afin de trouver un mécanisme d'activation efficace des défenses immunitaires vis-à-vis des cellules cancéreuses. Le défi est d'autant plus grand que la concentration des antigènes est faible et que leur présentation par les molécules du CMH est parfois inadéquate.

L'objectif est donc d'identifier des peptides antigéniques spécifiques des tumeurs qui doivent être capables de stimuler efficacement les défenses immunitaires in vivo, en particulier les lymphocytes T cytotoxiques.

5 Ces peptides peuvent servir de vaccin comprenant en option des co-stimulateurs tels que des cytokines et des lymphokines.

Farace et al, (1997), a démontré que l'induction de la réponse inflammatoire dans l'hypersensibilité de type retardé et au site du vaccin chez un patient immunisé, provient du recrutement de

10 seulement quelques clones de cellules T. Ces cellules correspondent aux lymphocytes infiltrés à l'intérieur d'une tumeur et déjà amplifiés avant immunisation. Ainsi, les antigènes des tumeurs peuvent être utilisés pour recruter et amplifier localement les lymphocytes T spécifiques des

15 tumeurs. Les cellules activées in vivo peuvent être d'avantage amplifiées par l'administration d'IL-2. En effet, Kumar A. et al (1996), a montré que l'activité des clones des cellules T est induite dans le sang, et dans les tumeurs, des patients recevant l'IL-2.

Il a été difficile d'isoler et d'amplifier les clones des Lymphocytes T

20 cytotoxiques (CTL) spécifiques des cellules du carcinome du rein, Bernhard et al, (1994), et Brouwenstijn et al, (1996). Cette difficulté provient du défaut de prolifération des lymphocytes infiltrés dans une tumeur (TIL), particulièrement dans les cellules du carcinome du rein (RCC), Alexander et al, (1993). Cependant certains résultats indiquent

25 que les RCC pourraient être immunogéniques in vitro car ces tumeurs sont souvent largement infiltrées par les lymphocytes T, en particulier par les lymphocytes TCR  $\alpha/\beta^+$  DR $^+$  Th1- polarisés, Angevin et al, (1997), et à cause du taux de réponse relativement élevé (15 à 20%) à certains protocoles d'immunothérapie, Rosenberg et al, (1992).

30 Un antigène, reconnu par des CTL autologues du RCC, a été identifié par Gaugler et al, (1996). Cet antigène est codé par un gène, appelé

RAGE 1, qui est exprimé dans de nombreuses tumeurs mais qui est absent des tissus adultes normaux, sauf ceux de la rétine. Il est clair que l'utilisation de RAGE 1 pour l'immunothérapie du cancer présente des problèmes car cela pourrait générer des réactions de rejet auto-immunitaires de la rétine. Des préparations, comportant l'association HSP-peptide isolée à partir de cellules cancéreuses ou de cellules infectées par des virus, confèrent une protection immunitaire vis-à-vis des tumeurs et des cellules infectées, Blachere et al, (1997). D'autres documents, tels que WO 97/10001, WO 97/06828, WO 97/26910, Tamura et al, (1993) et (1997), concernent le traitement de cellules néoplastiques par des complexes HSP70-peptides dérivés de cellules cancéreuses. Ces documents de l'art antérieur décrivent la capacité d'HSP70 à absorber comme une éponge les peptides des cellules. L'isolement d'HSP70 provenant de cellules cancéreuses permet de co-isoler de multiples fragments protéiques de tumeurs qui peuvent potentiellement être antigéniques.

Ainsi, aucun document de l'art antérieur ne divulgue, ni ne suggère la présente invention telle que définie ci-dessous.

## **Description de l'invention**

Ainsi, la présente invention concerne des composés peptidiques caractérisés en ce qu'il comporte au moins une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'homologie avec les acides aminés entre les positions 286 et 294 d'HSP-70. Lesdits composés peptidiques comportent l'isoleucine, la leucine, la valine, l'alanine, la glycine ou la phénylalanine à la position 293, et plus particulièrement l'isoleucine. Les composés peptidiques préférés de l'invention ont au moins une des séquences suivantes :

- SEQ ID n°1 : 286-SLFEGIDY-294
- SEQ ID n°2 : 286-SLFEGIDIYT-295.
- SEQ ID n°3 : 286-SLFEGIDFYT-295.

On entend par composé peptidique une entité constituée au minimum par un fragment peptidique d'HSP70 tel que défini ci-dessus ou par une succession desdits fragments peptidiques, et ayant éventuellement un ou plusieurs autres éléments différents des acides aminés naturels. Ces  
 5 éléments ont pour but de protéger chimiquement ou physiquement lesdits fragments peptidiques, et/ou de favoriser leur absorption par l'organisme, et/ou leur administration, et/ou leur biodisponibilité. Par exemple, cette protection permet aux peptides d'atteindre leurs cibles sans subir l'action de diverses protéases présentes dans l'organisme. De  
 10 telles modifications chimiques peuvent également augmenter l'affinité d'un peptide antigénique pour les molécules HLA-A2 et permettre une efficacité accrue du vaccin in vivo, Rosenberg et al, (1998).

Lesdits éléments peuvent être par exemple:

- Des groupes chimiques protecteurs connus par l'homme du métier réagissant aux extrémités NH<sub>2</sub> et/ou COOH d'un peptide, cette  
 15 modification ne baissant pas significativement le caractère immunogénique du peptide.
- Des groupes chimiques améliorant l'efficacité du vaccin in vivo.
- Des lipides ou des acides gras que l'on attache de façon covalente  
 20 aux fragments peptidiques pour former des composés peptidiques appelés lipopeptides. L'acide palmitoïque en est un exemple parmi d'autres, Vitiello et al, (1995), incorporé dans la description par référence.
- Une protéine porteuse desdits fragments peptidiques possédant des  
 25 sites de restriction et permettant l'acheminement des fragments peptidiques intacts jusqu'à leurs sites d'action dans l'organisme.

Un deuxième aspect de l'invention concerne les fragments d'ADN codant pour les fragments peptidiques ci-dessus mentionnés. On entend par  
 30 fragments d'ADN des fragments simples brins, double brins, d'ADN, d'ADNc et/ou d'ARN. La séquence nucléotidique correspondant à la séquence d'acides aminés desdits fragments peptidiques peut varier de manière à comprendre tous les différents codons possibles pour un acide aminé donné selon le principe de la dégénérescence du code

génétique. La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression d'un fragment peptidique contenant un fragment d'ADN ci-dessus mentionné, fusionné à un promoteur fort et efficace dans les cellules eucaryotes, et/ou dans les cellules procaryotes, en particulier dans les cellules humaines. Le vecteur peut comporter des marqueurs de sélection et exprimer des adjuvants immunologiques tels que des cytokines et/ou des lymphokines.

L'invention concerne également des cellules dendritiques chargées en composés peptidiques, et des cellules dendritiques transformées par le vecteur d'expression exprimant les fragments peptidiques. Ces cellules peuvent être aussi des macrophages. Nestle et al, (1998), décrit une méthode de vaccination qui consiste à charger les cellules dendritiques prises à un patient par des peptides antigéniques (en culture in vitro), et les injecter dans le système lymphatique de ce même patient. Cette publication est incorporée dans la description par référence.

Un autre aspect de l'invention porte sur une composition pharmaceutique, comprenant un composé peptidique mentionné ci-dessus ou un mélange desdits composés peptidiques et en option un ou plusieurs facteurs cytotoxiques des tumeurs (cytokines, lymphokines) par exemple IL-2, IF- $\gamma$  et TNF, et/ou et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Une composition pharmaceutique de l'invention peut comprendre ledit vecteur d'expression et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Le véhicule pharmaceutique peut être notamment un liposome, une nano-particule, ou une émulsion lipidiques, chargés positivement ou négativement.

Un autre aspect de l'invention porte sur l'utilisation desdites compositions pour la fabrication d'un médicament. Ledit médicament est notamment destiné pour le traitement du cancer, en particulier des tumeurs solides, avantageusement des carcinomes, des mélanomes, des neuroblastomes, des cancers du cou et/ou de la tête, de préférence des carcinomes du rein. Plus spécifiquement, il est avantageux d'utiliser les composition comprenant un ou des composés peptidiques pour la fabrication d'un médicament destiné à une immunisation ex situ, et les

compositions comprenant ledit vecteur d'expression ou lesdites cellules dendritiques pour la fabrication d'un médicament destiné à une immunisation in situ.

Les compositions de l'invention sont utiles pour stimuler les défenses immunitaires, en particulier pour augmenter la population des CTL des tumeurs et/ou induire la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques tels que par exemple IL-2, IF- $\gamma$  et TNF.

Les mutants à la position 293 d'HSP70-2, et le mutant portant spécifiquement une isoleucine à la position 293, sont désignés respectivement par HSP70-2-293 et HSP70-2 I-293. Ainsi, un autre aspect de la présente invention, également important, porte sur un procédé de production d'un anticorps qui se lie au mutant HSP70-2-293, en particulier au mutant HSP70-2 I-293, comprenant les étapes consistant à :

- 15 a) Immuniser un mammifère avec un composé peptidique caractérisé en ce qu'il comporte notamment une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'homologie avec les acides aminés entre les positions 286 et 294 de HSP-70, en particulier un composé peptidique ayant la séquence SEQ ID n°1 ou SEQ ID n°2 ou SEQ ID  
20 n°3.
- b) Isoler un anticorps monoclonal qui se lie spécifiquement à HSP-70-2-293, particulièrement à HSP70-2 I-293, dans un essai immunologique.

La présente invention comprend aussi un anticorps monoclonal qui se lie à HSP-70-2-293, particulièrement à HSP70-2 I-293 et un procédé de  
25 détection de la mutation d'HSP70-2-293, en particulier de la mutation HSP70-2 I-293, dont les étapes consistent à :

- a) Mettre en contact un échantillon prélevé chez un individu avec un ledit anticorps monoclonal,
- 30 b) permettre la formation du complexe anticorps- HSP70-2-293,
- c) détecter HSP70-2-293 au moyen d'un marqueur détectable dans le complexe ou qui se lie au complexe.

Dans un mode supplémentaire de réalisation, la présente invention concerne une trousse de diagnostic comportant notamment un ou

plusieurs desdits anticorps. Cette trousse peut notamment servir pour la détection du cancer et pour le pronostique du cancer déclaré chez un individu. Enfin, l'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs desdits anticorps  
5 monoclonaux et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. La présente invention concerne, au même titre, l'utilisation de la composition pharmaceutique susmentionnée en médecine, pour la fabrication d'un médicament, notamment pour le traitement du cancer, en particulier pour le traitement des tumeurs solides, avantageusement  
10 des carcinomes, des mélanomes, des neuroblastomes, des cancers du cou et de la tête, de préférence des carcinomes du rein.

#### **Description détaillée de l'invention.**

15

L'objet de présente invention permet donc de stimuler les défenses immunitaires en augmentant la population des CTL spécifiques des tumeurs et en induisant la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques. Une telle amplification des CTL spécifiques revient à  
20 entraîner et à agrandir une véritable armée de cellules qui détruisent les tumeurs. En effet, les Lymphocytes T cytotoxiques jouent un rôle particulier dans la reconnaissance des antigènes et s'infiltrant à l'intérieur même des tumeurs solides. L'activité des CTL consiste à reconnaître l'antigène associé aux molécules de classe 1 du CMH  
25 syngénique. Les CTL et la cellule cible forment alors une liaison par l'association TCR-CD8 au CMH I.

Les étapes du mécanisme de la cytotoxicité sont les suivantes :

- Reconnaissance, liaison hautement spécifique, et formation du complexe ternaire TCR-CD8-MCHI(peptide antigénique).
- 30 - Sécrétion par les CTL de la perforine et des différentes enzymes en direction de la membrane de la cellule cible.

- Formation de canaux dans la membrane de la cellule polymérisation de la perforine par une enzyme en présence de calcium (canaux polyperforines).
- Passage de protéases et de toxines à travers les canaux et action sur l'intérieur de la cellule cible.
- D'autres facteurs toxiques tels que le  $\text{TNF-}\alpha$ , la lymphotoxine ( $\text{TNF-}\beta$ ), et l' $\text{IFN-}\gamma$  libérés par les CTL se fixent sur des récepteurs spécifiques de la membrane de la cellule cible. On observe alors une apoptose, caractérisée par la fragmentation de l'ADN, par des bourgeonnements de la membrane cytoplasmique, par la désintégration de la cellule en petits fragments (corps apoptotiques).

Un objet de l'invention est donc de fournir à l'organisme des quantités suffisantes de peptides à fort potentiel immunogénique et spécifiques des tumeurs. De tels fragments peptidiques sont très rares, dilués parmi une infinité de peptides, et difficiles à identifier. En effet, la liaison des peptides avec la molécule du CMH se situe dans une invagination de topologie et de propriétés physico-chimiques précises, qui varient selon la nature des acides aminés impliqués. Ainsi un peptide (environ 9 acides aminés) se lie à un CMH en fonction de la nature de ces chaînes latérales et de sa complémentarité avec la cavité de la molécule du CMH. Cette association au CMH se réalise dans des organismes intracellulaires particuliers. Les protéines antigéniques sont généralement dégradées en peptides dans les protéasomes (complexes de protéinases multicatalytiques ubiquitaires) avant le transport desdits peptides dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER). La synthèse des CMH I et l'assemblage avec les peptides a lieu dans le RER. Puis les complexes antigène-CMH I sont exportés à la surface des cellules en passant par l'appareil de Golgi. On comprend donc pourquoi seuls certains peptides peuvent se lier au CMH I. En ce qui concerne les peptides de la présente invention, on a démontré (V. infra) qu'ils



possèdent une constante de dissociation  $K_d$  très faible (très forte association). En ce sens, ils permettent d'activer le système immunitaire efficacement, en particulier les CTL.

5 Les CTL spécifiques du RCC peuvent être isolés à partir des lymphocytes infiltrés dans la tumeur (TIL) d'un patient. Au moins 80% des TIL du RCC sont des cellules  $CD8^+$   $DR^+$   $LAG-3^+$  activées, Angevin et al, (1997). A la suite d'une courte activation in vitro de ces TIL, une réponse de type polarisé  $Th1$  a été observée (sécrétion d'IL-2 et  
10 d'interféron  $\gamma$ , mais pas d'IL-4). En revanche, Finke et al, (1993) a publié que le défaut apparent d'activité des TIL in vivo est dû aux mauvais fonctionnement des différentes cascades de régulation dans ces cellules. Cependant, parmi les 5 CTL décrits dans la présente invention, le clone 2A11 (TCRBV1J1S6) est particulièrement intéressant  
15 puisqu'il est amplifié au site de la tumeur et représente jusqu'à 3% des TCR  $\alpha/\beta^+$  TILs. De plus, ce clone reconnaît un antigène spécifique des tumeurs présenté par HLA-Cw16, Angevin et al, (1997). Ceci démontre donc que les molécules HLA-C sont capables de présenter des éléments au site de la tumeur chez ce patient.

20 HSP70 est codé par le locus dupliqué (HSP70-1, HSP70-2) localisé dans la région MHC à 92 Kb du gène C2 en direction du télomère, Milner et al, (1990). Ce segment d'ADN est appelé région de classe IV et comprend au moins 7 gènes impliqués dans les réponses inflammatoires et de stress, Gruen, (1997). Les deux gènes sans intron  
25 (HSP70-1 et HSP70-2) codent pour une protéine identique de 641 acides aminés. Il y a quelques différences de séquences dans la région promotrice et une complète divergence dans la région 3' non traduite. En utilisant une sonde spécifique d'HSP70-2, on a montré une élévation de la quantité d'ARNm (2,4 Kb) à la suite d'un choc thermique. La sonde  
30 HSP70-2 a permis de détecter une faible quantité de d'ARNm de 2,4 Kb dans l'ARN constitutif des lignées cellulaires de la tumeur RCC et dans

des échantillons chirurgicaux congelés de ladite tumeur. La raison pour laquelle la lignée cellulaire allogénique HLA-A2<sup>+</sup> RCC, qui exprime de faibles niveaux d'ARNm HSP70-2, n'a pas été tuée par CTL 11C2, peut être due à la différence observée lors des essais de sensibilisation de la cible (Target Sensitization Assays) entre les peptides mutés et le décapeptide sauvage 286-295 ( $5 \times 10^{-11}$  M et  $5 \times 10^{-8}$  M respectivement pour la demi-lyse maximale). Puisqu'il est improbable que la mutation ponctuelle à la position 293 ait lieu dans chacune des 6 lignées cellulaires allogéniques HLA-A2<sup>+</sup> testées dans les essais de cytotoxicité, on peut conclure que l'association du décapeptide sauvage 286-295 avec HLA-A2 dans les cellules cibles n'est pas suffisant pour induire la mort des CTL 11C2. En revanche, la transcription et la surexpression d'HSP70-2 sauvage dans les cellules COS-7 induisent la sécrétion de TNF par CTL 11C2.

On sait que les HSP sont des molécules non polymorphiques, qui ne diffèrent pas dans leur structure primaire parmi les tissus normaux et les cancers ou parmi les cellules normales et les cellules infectées par des virus. Ainsi, la capacité d'immunisation de préparations comprenant HSP est due à l'association des molécules HSP avec des peptides générés par les cellules dans lesquelles les HSP ont été isolés. En effet, les complexes HSP-peptides peuvent être générés in vitro et l'activité biologique de tels complexes est comparable à celle des complexes HSP-peptide générés in vivo, Blachère et al, (1997). Si cette observation démontre que les HSP sont des adjuvants élicitant une réponse des cellules T CD8<sup>+</sup>, nos résultats indiquent que certains fragments peptidiques d'HSP70 sont directement immunogènes.

Pour la suite de la description et pour les exemples, on se référera aux figures dont la légende est indiquée ci-dessous.

### Légendes

- 5 **Figure 1 : Activité spécifique lytique du clone 11C2 contre la lignée cellulaire autologue RCC-7.**

La cytotoxicité des CTL-11C2 vis-à-vis de la lignée cellulaire RCC-7 a été testée par l'expérience standard de libération du chromium (chromium release assay) à différents ratios effecteur/cible (ratio E/C).  
10 L'inhibition de l'activité cytotoxique de 11C2 a été testée après plusieurs préincubations des CTL pendant deux heures avec le mAb (anticorps monoclonal) de classe 1 anti-HLA indiqué, à une concentration de saturation prédéterminée.

15

- Figure 2 : Sécrétion de TNF par le clone CTL-11C2 lors de la stimulation avec la lignée cellulaire autologue RCC-7.**

5 000 CTL ont été incubés avec 20 000 cellules RCC-7. La  
20 quantité de TNF a été mesurée après 20 heures de culture, en testant la toxicité des surnageants avec des cellules WEHI-164 (clone 13) sensibles au TNF. L'inhibition de la sécrétion de TNF a été testée après préincubation du clone 11C2 pendant deux heures avec le mAb anti-HLA de classe 1 tel qu'indiqué.

25

- Figure 3 : Cytotoxicité des CTL 11C2 sur de multiples lignées cellulaires allogéniques RCC.**

30 11C2 a été testé sur la lignée autologue RCC-7 et sur de multiples lignées cellulaires allogéniques RCC (RCC-8, RCC-9, RCC-10 et RCC-11) lors d'une expérience standard de libération du chromium

au ratio E/C indiqué. Les molécules HLA qui correspondent sont indiquées entre parenthèses.

**Figure 4 : Stimulation du CTL 11C2 par les cellules co-transfectées temporairement avec l'ADNc HLA-A\*0201 autologue et l'ADNc A18.**

On a rajouté le CTL 11C2 48 heures après la co-transfection. Le TNF contenu dans les surnageants a été estimé 20 heures après en testant sa toxicité sur les cellules WEHI-164 (clone 13). Les cellules stimulatrices comprennent la lignée cellulaire RCC-7 comme contrôle positif et les cellules COS-7 non transfectées ou transfectées avec l'ADNc HLA\*0201 seul, comme contrôle négatif.

**Figure 5 : Localisation de la région épitopique d'HSP70-2 reconnu par le CTL 11C2.**

(A) La longueur totale du l'ADNc HSP70-2 est représentée schématiquement en noir et blanc. 5' UT et 3' UT correspondent aux régions non traduites 5' et 3' respectivement. La région codante (en noir) commence avec le site d'initiation de la traduction (codon ATG) et correspond au nucléotide nt+1. Les multiples clones tronqués obtenus à partir de l'ADNc A18 sont représentés en gris. L'ADNc A18 commence au nucléotide 577 de la région codante. Le nucléotide muté est marqué par une astérisque (position 877).

(B) illustre la stimulation du CTL 11C2 par les cellules COS-7 co-transfectées temporairement avec le l'ADNc HLA-A\*0201 autologue et avec chacun des différents ADNc A18 tronqués. Les cellules transfectées ont été incubées pendant 24 heures avec 5 000 CTL 11C2 et la quantité de TNF a été mesurée 20 heures après. Les cellules

stimulatrices contrôles comprennent les cellules COS-7 non transfectées ou transfectées avec l'ADNc A18 seul comme contrôle négatif et co-transfectées avec les ADNc A18 et A'0201 comme contrôle positif.

5

**Figure 6 : Lyse par CTL 11C2 de la lignée cellulaire autologue transformée par EBV et incubée avec les peptides codés par HSP70-2**

2 000 cellules transformées par EBV, marquées avec Cr <sup>51</sup> ont été incubées pendant 1 heure en présence des peptides d'HSP70-2 indiqués à de multiples concentrations. CTL 11C2 a ensuite été ajouté à un ratio effecteur/cible (E/C) de 31/1. Le relargage du chrome a été mesuré 4 heures après. Les astérisques indiquent l'acide aminé muté.

**Figure 7 : Induction de l'expression d'HLA-A2 sur les cellules T2 par les peptides antigéniques d'HSP70-2.**

Les cellules T2 ont été incubées à 26° C pendant 16 heures en milieu privé de sérum, avec ou sans peptide à une concentration de 20 µM. Ensuite, les peptides ont été de nouveau rajoutés et les cellules ont été incubées à 37° C. Aux intervalles de 30 minutes ou d'une heure, les culots des cellules ont été collectés et le changement de l'expression d'HLA-A2 a été analysé par cytométrie de flux avec un mAb anti-HLA-A2 (MA2.1). Les séquences d'acides aminés des peptides sont représentées, l'acide aminé muté est représentée par une astérisque.

**Figure 8 : Analyse Northern Blot**

L'ARN cytoplasmique total (15 µg), dérivé de la tumeur RCC-7 (rangé n°1), de la lignée cellulaire RCC-7 (n°2), et la lignée cellulaire autologue transformée par EBV (n°3), soit maintenu à 37°C (sous-

rangé C) ou traité par choc thermique pendant 2 heures à 40° C (sous-rangé HS), a été fractionné sur gel d'agarose-formaldéhyde dénaturant et transféré sur membrane de nylon Hybond-N+. Le Northern Blot a été hybridé par les sondes constituées d'un fragment spécifique d'HSP70 et  
5 de l'ADNc de la glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase (GAPDH). La position de la migration des ARN 28s et 18s est présentée. Le transcript HSP70-2 d'environ 2, 4 Kb est indiqué par une flèche au-dessus de l'ARN 18s et de l'ARNm GAPDH.

10

Les travaux de la présente invention ont permis l'isolation de clones CTL-RCC provenant de TIL (lymphocytes infiltrés dans la tumeur) obtenus lors de trois expériences différentes et en utilisant deux conditions expérimentales (utilisation de IL-2 ou de IL-2 + IL-7 +  
15 IL-12). Entre le 20<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour, les cellules, appartenant aux cultures qui montrent une lyse importante de la lignée cellulaire autologue de la tumeur RCC-7, ont été clonées par dilution limite. Sur 8 clones obtenus par ce protocole, 5 ont été retenus en fonction de leur phénotype TCR distinct. Tous les clones sont des cellules cytotoxiques  
20 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> et produisent TNF lorsqu'ils sont stimulés par des cellules autologues de la tumeur. L'effet bloquant des mAb anti-classe 1 WC/32 a montré que l'activité cytotoxique est restreinte aux molécules CMH I (Figure 1). L'activité lytique du clone 11C2 a été bloquée par mAb MA2.1 spécifique de HLA-A2 (figure 2). Ce résultat suggère que HLA-A2  
25 est la molécule de présentation pour 11C2, et que 11C2 reconnaît les cellules autologues des tumeurs (figure 3).

### **Identification de l'ADNc de l'antigène reconnu par CTL 11C2**

30 Afin d'identifier le gène codant pour l'antigène on a utilisé une approche génétique, comprenant la transfection d'une librairie d'ADNc

provenant de la tumeur RCC dans des cellules COS-7 avec l'ADNc codant pour la molécule HLA-A2 de présentation, Seed B., (1987). Le vecteur d'expression utilisé contient l'origine de réplication de SV40, ce qui permet une multiplication considérable des épisomes du plasmide transfecté et donc une expression élevée des gènes transfectés. On a utilisé une librairie d'ADNc construite dans le vecteur d'expression pcDNA I en utilisant les ARN provenant de la lignée cellulaire RCC-7. Cette librairie a été divisée en 400 parties de 200 plasmides recombinants et chaque partie a été co-transfectée en double avec la construction pcDNA I HLA-A\*0201 autologue dans les cellules COS-7. Les cellules COS-7 ont ensuite été testées pour leur capacité à stimuler la production de TNF par le clone 11C2. Après 48 heures, les cellules COS-7 co-transfectées ont été incubées durant la nuit avec 11C2 et la concentration de TNF dans le surnageant a été déterminée par son action cytotoxique sur des cellules WEHI. La quantité de TNF dans les surnageants est en dessous de 5 pg/ml sauf pour deux paires (40 et 45 pg/ml) d'expériences dupliquées. Le deuxième criblage a été réalisé en transfectant les cellules COS avec 100 parties de 20 plasmides recombinants provenant de l'extraction de doubles positifs. Enfin, un troisième criblage nous a conduit à l'isolation de deux clones d'ADNc (appelés A8 et B65), qui permettent de transférer l'expression de l'antigène dans les cellules COS-7 HLA-A\*0201+. Les résultats obtenus avec le clone d'ADNc A18 est présenté à la figure 4.

La séquence du plus long ADNc (A18) est de 1,9 Kb avec une homologie de 100% aux nucléotides de 577 à 2876 de l'ADNc d'HSP70-2, à l'exception d'une mutation à la position 877 (une adénine au lieu d'une thymine). La position +1 est le site d'initiation de la traduction d'HSP70-2, Milner et al, 1990.

Dans le but d'identifier la longueur totale de l'ADNc d'HSP70-2 et pour vérifier si la mutation est seulement présente au site de la tumeur, nous avons réalisé une PCR (HSP70-2 est un gène sans intron) sur l'ADN

provenant de l'extraction des cellules RCC-7 et des cellules B transformées par EBV et des blastes PHA. Un produit unique de 2 Kb, correspondants au nucléotide -36 -1974, a été obtenu dans chacun des cas et a été subcloné dans le vecteur pcDNA I pour séquençage et expression. 4 des 7 clones d'ADN, obtenus à partir du fragment de la tumeur, possède la mutation. Pour les cellules transformées par EBV et les blastes, aucune des 14 séquences d'ADN analysées ne porte la mutation. Ainsi, la mutation est présente seulement sur un chromosome dans les cellules tumorales et absente dans les cellules normales.

### **Identification du peptide antigénique**

Afin de délimiter la région nucléotidique minimale codant pour le peptide antigénique, de multiples ADNc tronqués ont été obtenus à partir du clone d'ADNc A18. L'utilisation de l'exonucléase III a permis de générer progressivement des délétions à partir de l'extrémité 3' de l'ADNc (figure 5). Ces fragments d'ADNc ont été co-transfectés dans les cellules COS-7 avec l'ADNc HLA-A\*0201 autologue. Une région nucléotidique minimale codante a été localisée entre les nucléotides 730 et 944. La troncation dans la région portant l'unique mutation spécifique de la tumeur abolit la reconnaissance par CTL 11C2. On a recherché des peptides portant le motif de liaison HLA-A\*0201 dans cette région et parmi les 18 peptides testés, seulement 2 (le nonapeptide SLFEGIDIY, acides aminés 286 à 294, et le décapeptide SLFEGIDIYT, acides aminés 286 à 295), portant le résidu mutant isoleucine à la position 8, furent reconnu. La demi-lyse maximale a été obtenue avec seulement  $5 \times 10^{-11}$  M du décapeptide comparée à  $5 \times 10^{-7}$  M du nonapeptide (figure 7). CTL 11C2 reconnaît également le décapeptide sauvage 286-295 (SLFEGIDFYT) avec une demi-lyse maximale de  $5 \times 10^{-8}$  M mais pas le nonapeptide sauvage 286-294 (figure 6).



### **Liaison des fragments peptidiques d'HSP70-2 à HLA-A2**

Les peptides antigéniques, pouvant lier HLA-A2, peuvent réguler positivement l'expression des molécules HLA-A2 dans les cellules T2, Nijman et al. (1993). La capacité de liaison des décapeptides 286-295 d'HSP70-2 (muté et sauvage) a été comparée à celle du nonapeptide 286-294. La liaison de ces deux décapeptides est stable sur une période de 4 heures à 20  $\mu$ M sans présenter de différence entre les formes mutantes et sauvages (figure 8). Les nonapeptides HSP70-2 sont moins efficaces, mais leur liaison est comparable à celle du peptide MART-1 sur HLA-A2. Comme on pouvait s'y attendre, aucun effet n'a été observé pour le peptide contrôle HLA-B7 (voir figure 8).

### **Analyse Northern blot**

Une sonde spécifique au locus HSP70-2, incluant la région 3' non traduite, a été utilisée pour examiner l'expression du gène HSP70-2. Un ARNm de 2,4 Kb a été mis en évidence dans les cellules autologues transformées par EBV. De même, un faible niveau d'expression a été observé dans les cellules RCC-7 non traitées et dans les échantillons chirurgicaux congelés de RCC-7 (figure 8). De faibles niveaux d'expression ont également été observés dans d'autres tumeurs, notamment dans les mélanomes, les neuroblastomes, les adénocarcinomes du colon et les fragments de tumeurs de la vessie.

### **Exemple 1 : Etablissement des lignées cellulaires RCC.**

Les lignées cellulaires ont été établies à partir des cellules du carcinome du rein RCC comme décrit précédemment par Angevin et al, 1997. En résumé, les tumeurs primaires ont été obtenues à partir de patients non traités qui ont subi une néphrectomie radicale en notre institution. Le patient 7 (HLA-A2, -A29 -B44, -B51 -Cw15, -Cw16) est

un individu mâle de 54 ans avec un RCC métastatique. Après chirurgie et digestion enzymatique, des suspensions de cellules fraîches des tumeurs RCC ont été ensemencées dans un milieu de culture composé de Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), pénicilline (50 IU/ml),  
5 streptomycine (50 µg/ml), 1% de L-glutamine à 200 mM, 1% de sodium pyruvate à 200 mM, 10% de sérum fœtal de veau (FCS), et 1% de Ultrosor G (Gibco-BRL, Paisley, UK). Ce milieu est appelé dans la suite du document « milieu RCC ». Toutes les lignées des cellules tumorales ont été maintenues dans ce milieu RCC. La lignée cellulaire RCC-7 a été  
10 obtenu à partir de la tumeur primaire du patient 7.

### **Exemple 2 : Cellules et milieux de culture**

La lignée cellulaire autologue EBV a été obtenue après infection  
15 de PBMC du patient 7. La lignée cellulaire transformée par EBV a été maintenue dans RPMI 1640 (Gibco-BRL), supplémentée avec 10% de FCS.

Le clone 13 de WEHI-164, une lignée cellulaire du fibrosarcome de la souris sensible à TNF, a été fourni avec diligence par Benoit Van  
20 Den Eynde (Ludwig Institute for Cancer Research, Bruxelles, Belgique) et a été mis en culture dans RPMI 1640 (Seromed, Biochrom KG, Berlin, Allemagne) supplémenté avec de la L-glutamine, du sodium pyruvate, des antibiotiques, et 5% de FCS à une concentration de 0,01 à 0,05 x 10<sup>6</sup> cellules/ml.

25 La lignée cellulaire humaine mutante CEM x 721.174.T2 (T2), Salter et al, (1989), a été maintenue dans RPMI-1640 supplémenté avec 10% de FCS. Cette lignée cellulaire a été fournie avec diligence par Pierre Langlade (Institut Pasteur, Paris, France). Toutes les cultures cellulaires ont été maintenue dans une atmosphère saturée en eau, et  
30 avec une teneur de 5% en CO<sub>2</sub>.

**Exemple 3 : Etablissement des lignées cellulaires TIL**

Les TIL, provenant des suspensions de la tumeur, ont été inoculés dans des flasques contenant RPMI 1640, de la pénicilline, de la streptomycine, 1% de L-glutamine, 1% de sodium pyruvate et 8% de sérum humain AB (Institut Jacques Boy S.A., Reims, France), appelées milieu complet. Deux conditions de stimulation ont été utilisées :

1- Les TIL ont été cultivés comme décrit précédemment, Angevin et al (1997). Les TIL ont été inoculés à une concentration finale d'environ  $2 \times 10^6$  TIL/ml en milieu complet supplémenté avec 5 IU/ml de rIL-2 (Roussel-Uclaf, Romainville, France). A partir du 3<sup>ème</sup> jour, les cultures ont été nourries tous les trois jours en utilisant le milieu complet avec 30 IU/ml de rIL-2 et 3% de facteur de croissance des cellules T (TCGF).

Dans la deuxième condition, les TIL ont étéensemencés à la même concentration en milieu complet supplémenté avec 10 IU/ml de rIL-2, 50 IU/ml de rIL-7 (Sanofi, Toulouse, France) et 10 IU/ml de rIL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA) pendant trois jours. A partir du 3<sup>ème</sup> jour, les TIL ont été nourris en utilisant le milieu complet avec 30 IU/ml de rIL-2, 50 IU/ml de rIL-7 et 10 IU/ml de rIL-12. Le phénotype et l'activité cytotoxique des lignées cellulaires TIL ont été caractérisés après 14 et 21 jours de stimulation.

**Exemple 4 : Anticorps monoclonaux (mAb), agent sérologique, et analyse phénotypique**

Les mAb conjugués soit à la fluorescéine (FITC) ou avec la phycoérythrine (PE), dirigés contre le TCR  $\alpha/\beta$ , CD3 (Leu4), CD4 (Leu3a), CD8 (Leu8), CD80 (B7.1), HLA DR (L249), ont été achetés chez Becton Dickinson (Mountain View, CA). CD56 (NKH1A) provient de Coultronics (Hialeah, FL). Les TIL ont été caractérisés par double

immunocoloration en incubant les cellules pendant 30 mn à 4° C avec FITC- ou PE-mAb. L'analyse de cytométrie de flux a été réalisée sur un FACScan (Becton Dickinson) et en utilisant le logiciel Cellquest. Les ascites du Laboratoire ont été W6.32 (anti-HLA-A/B/C), MA2.1 (anti-  
 5 HLA-A2 et -B17) et B1.23.2 (anti-HLA-B/C) et ont été sélectionnés pour les expériences fonctionnelles et d'immunofluorescence à des concentrations de saturation prédéterminées jusqu'à une dilution finale entre 1/200 et 1/2000.

#### 10 **Exemple 5 : Clonage des lignées cellulaires TIL**

Après 3 semaines de culture, les lymphocytes ont été clonés en les diluant jusqu'à la limite. Le clonage a été réalisé entre 600 à 0,6 cellules/puits dans des plaques à 96 puits contenant le milieu RPMI,  
 15 supplémenté de 8% de sérum humain AB, 30 IU/mL de rIL-2 et 3% de TCGF. Au fond des puits, on a cultivé une couche nourricière constituée de cellules tumorales autologues irradiées ( $1 \times 10^4$  / puits), de lymphocytes allogéniques irradiés ( $8 \times 10^4$  par puits) et de cellules irradiées transformées par EBV ( $2 \times 10^4$  / puits). Les clones ont été  
 20 nourris 3 fois par semaine avec le milieu complet contenant rIL2 et TCGF. Le phénotype immunologique et la cytotoxicité ont été caractérisés pour les cellules clonées.

#### **Exemple 6 : Test de cytotoxicité**

25

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés en utilisant l'expérience standard de libération du chrome pendant 4 heures comme précédemment décrit, Angevin et al (1997). En résumé,  $2 \times 10^3$  cellules cibles marquées au  $\text{Cr}^{51}$  ont été incubées pendant 4 heures à 37° C  
 30 avec les cellules effectrices à différents ratio E/T dans un volume final de 200  $\mu\text{l}$ . Concernant l'inhibition de la lyse par les mAb, les cellules

cibles ont été préincubées pendant deux heures en présence de concentrations saturantes de mAb avant l'addition des cellules effectrices. A la fin de l'incubation, 40 µl de surnageant ont été transférés sur plateau « Lumaplate 96 solid scintillation plates »  
 5 (Packard Instruments, Meriden, CT), ont été séchés toute la nuit, et comptés dans un compteur de radioactivité Beta (Packard Instruments).

### **Exemple 7 : Clonage et expression des molécules HLA**

10 Les allèles HLA de classe 1 ont été clonés en utilisant la méthode PCR décrite par Ennis et al, (1990), avec quelques légères modifications. L'ARN total a été préparé à partir de la lignée cellulaire RCC-7 en utilisant RNA<sup>B</sup> (Bioprobe Systems). Le premier brin d'ADNc a été synthétisé avec une sonde oligo(dT) et la reverse transcriptase  
 15 (Invitrogen). L'ADNc a servi de matrice pour une amplification PCR à 30 cycles avec les sondes suivantes :

- 5P2-H (5'-GGGCAAGCTTGGACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG-3'),  
 SEQ ID n°4

- 3P2-X (5'-GCCCTCTAGATCTCAGTCCCTCACAAGGCAGCTGTC-3'),  
 20 SEQ ID n°5

Ces sondes correspondent respectivement aux séquences consensus des régions non traduites 5' et 3' des allèles de classe 1. Ces sondes sont identiques aux sondes HLA-5P2 et HLA-3P2 décrites précédemment, Ennis et al. (1990), sauf pour le site de clonage (on a  
 25 remplacé les sites Sal I et Hind III pour 5P2 et Hind III et Xba I pour 3P2 respectivement. Les produits PCR ont été digérés avec Hind III et Xba I et ligaturés dans le plasmide pcDNA I (Invitrogen). Ces constructions ont été transfectées dans E. Coli MC 1061/P3. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait à partir de plusieurs colonies en utilisant des  
 30 colonnes GIAGEN (Qiagen). Le séquençage de l'ADN a été réalisé en utilisant "ABI PRISM Dye Terminator cycle sequencing ready reaction

kit", (Applied Biosystems) et un séquenceur d'ADN automatique. Les séquences ont été comparées aux séquences nucléotidiques HLA de classe I disponibles dans les banques de données.

#### 5 **Exemple 8 : Construction de la librairie d'ADNc**

L'ARN Poly(A)<sup>+</sup> a été extrait à partir de la lignée cellulaire RCC-7 en utilisant le système d'isolation d'ARNm (Fast Track kit 2.0, Invitrogen) en respectant les instructions du fabricant. Le premier brin  
10 de l'ADNc a été synthétisé en utilisant la transcriptase inverse AMV avec une sonde oligo-dT contenant un site Not I à son extrémité 5'. L'hybride ARN-ADNc crée par la synthèse du premier brin, a été transformé en ADNc double brin par l'ADN polymérase I en combinaison avec la Rnase H et l'ADN ligase d'E. Coli. Ensuite, on a  
15 utilisé l'ADN polymérase T4 pour faire une coupure franche dans l'ADNc. Des adaptateurs BstX I ont été rajoutés et la taille de L'ADNc a été obtenue par fractionnement sur gel d'agarose. L'ADNc de taille voulue (supérieure à 800 nucléotides) a été ligaturé à l'intérieur du vecteur pcDNA I coupé par BstX I/Not I et la souche E. Coli appropriée  
20 (MC1061/P3) a été transformée. Pour les expériences de criblage, l'ADN plasmidique obtenu à partir de certaines colonies de bactéries a été préparé selon le protocole suivant : 100 ou 200 colonies, cultivées en milieu LB-agar (avec 30 µl/ml d'ampicilline et 10 µl/ml de tétracycline), ont été ensemencées dans 2 ml de milieu LB et incubées toute la nuit à  
25 37° C. L'ADN plasmidique a été extrait en utilisant la méthode de lyse alcaline, Birnboim et al, (1979) et a été resuspendu dans 30 µl dans Tris 10mM-EDTA 1mM pH 7,5 contenant 20 µl/ml d'RNase A. La concentration de l'ADN plasmidique a été ajustée à 40 ng/µl.

#### 30 **Exemple 9 : Transfection des cellules COS-7 et criblage des transfectants**

Les expériences de transfection ont été réalisées par la méthode "DEAE-dextran-chloroquine, Brichard et al. (1993). Trois jours avant la transfection, les cellules COS-7 ont été ensemencées dans des plaques avec 96 micropuits à la concentration de  $5 \times 10^3$  cellules/puits dans 150  $\mu$ l de milieu RPMI contenant 20% de sérum fœtal de veau. Pour la transfection, le milieu a été remplacé par 30  $\mu$ l de DEAE-Dextran/mélange d'ADN. Ces mélanges ont été préparés pour des doubles transfections dans des micropuits en rajoutant séquentiellement :

- 200 ng d'ADN plasmidique provenant de la librairie d'ADNc,
- 200 ng de plasmide pcDNA I/HLA-A\*0201,
- 25  $\mu$ l de NaCl à 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4 (appelé tampon TBS),
- 35  $\mu$ l de TBS contenant 1 mg/ml de DEAE-Dextran (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Saclay, France).

Les cellules ont été incubées avec ce mélange plus 150  $\mu$ l de DMEM supplémenté avec 10% de « NuSerum » non complémenté (Becton Dickinson) et 100 mM de chloroquine (Sigma-Aldrich Chimie SARL, Saint Quentin Fallavier, France), pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite les cellules ont été incubées 4 heures à 37° C sous une atmosphère de 5% en CO<sub>2</sub>. Après incubation, le milieu a été enlevé, et les cellules ont été incubées 2 mn dans PBS 1x contenant 10% d'une solution de diméthylsulfoxyde. Les cellules ont été lavées 1 fois avec PBS 1x et incubées dans RPMI contenant 10% de FCS pendant 48 heures.

Le milieu a alors été enlevé et les cellules ont été lavées 1 fois avec PBS 1x. 5 000 CTL ont été rajoutés aux puits dans 100  $\mu$ l de RPMI contenant 10% de FCS. Après 20 heures, le surnageant a été collecté et sa teneur en TNF a été déterminée en testant sa cytotoxicité sur les clones 13 WEHI-164 dans un test colorimétrique MTT(3-[4,5-diméthylthiozole]-2,5-diphényle-tétrazolium bromide (Sigma-Aldrich), comme décrit précédemment, Traversari et al. (1992). Concernant

l'inhibition de la sécrétion de TNF par les mAb, les cellules cibles ont été préincubées pendant 2 heures en présence d'une concentration saturante de mAb avant l'addition des cellules effectrices pendant 20 heures de plus.

5

**Exemple 10 : Test PCR pour l'isolation de la longueur totale d'HSP70-2**

L'ADN génomique a été extrait à partir de la lignée cellulaire RCC-  
 10 7 avec DNAzol™ (Life Technologies). 1 µl de l'ADN a été utilisé pour une réaction PCR en utilisant l'ADN polymérase Taq (Perkin Elmer). Les sondes suivantes ont été utilisées :

- la sonde HSP70-2A, 5'-GGGCAAGCTTAGTCTCAGAGCGGAGCCAAC-3' (nucléotides -36 à -18, sense), SEQ ID n°6,
- 15 - la sonde HSP70-2B, 5'-GCCCTCTAGAGTCCCAACAGTCCACCTCAA-3' (nucléotides 1955 à 1974, anti-sense), SEQ ID n°7.

Ces sondes contiennent les sites de restriction Hind III et Xba I respectivement. Les conditions pour la PCR ont été 98° C pendant 1 mn suivie de 30 cycles d'amplification (98° C pendant 15 sec, 65° C  
 20 pendant 1 mn, 72° C pendant 2 mn, avec une extension finale pendant 10 mn à 72° C). Le produit PCR obtenu a été digéré par Hind III et Xba I, purifié sur billes de verre absorbant (Geneclean) et a ensuite été sous-cloné dans les sites Hind III et Xba I du vecteur d'expression pcDNA I pour séquençage et cotransfection avec HLA-A\*0201 dans les cellules  
 25 COS-7.

**Exemple 11 : Identification de la région minimale nucléotidique codante pour le peptide antigénique**

30 L'ADNc A18 a été isolé à partir de la librairie d'ADNc fabriqué à partir du vecteur d'expression pcDNA I. Le plasmide a été digéré avec



Sph I et Xba I avant traitement avec l'exonucléase III afin de générer des délétions progressives à partir de l'extrémité 3' de l'ADNc A18. Afin d'obtenir un nombre important de clones d'ADNc tronqués, on a utilisé le "Exo Mung Bean Deletion Kit" (Stratagene). Après ligature, la bactérie  
5 E. Coli MC1061/P3 a été transformée avec les ADNc tronqués. L'ADN plasmidique a été extrait à partir de chaque clone, puis séquencé et cotransfecté avec HLA-A\*0201 dans les cellules COS-7.

### **Exemple 12 : Synthèse et test de reconnaissance des peptides**

10

Dans le test de criblage, les peptides utilisés ont été synthétisés par la "PepSet technology" (Chiron Technologies, Suresnes, France). Pour les tests fonctionnels, les peptides ont été synthétisés sur phase solide en utilisant F-moc (protection NH<sub>2</sub>-terminale temporaire) et ont  
15 été purifiés par HPLC préparative. L'HPLC analytique indique que les peptides sont purs au moins à 95%. Les peptides lyophilisés ont été dissous à 10 mM de DMSO dans l'eau et conservés à -20° C. On a utilisé les peptides lors d'un test de libération du chrome. 2 000 cellules autologues transformées par EBV, et marquées au Cr<sup>51</sup>, ont été  
20 incubées pendant 1 heure à 37° C sur des plaques à 96 puits avec diverses concentrations de peptides avant d'ajouter CTL 11C2.

### **Exemple 13 : Test de liaison des peptides**

25

Les cellules T2, Nijman et al. (1993), ont été cultivées 48 heures avant le test dans un milieu AIM-V privé de sérum (Gibco-BRL). Pour les tests de liaison, les cellules T2 (10<sup>6</sup>) ont été incubées à 26° C pendant 16 heures dans le même milieu dans 0,8% de DMSO, avec ou sans peptide à une concentration de 20 µM. Ensuite les peptides (20  
30 µM) ont été de nouveau rajoutés et les cellules ont été incubées à 37° C. A des intervalles de 30 mn ou d'une heure, les culots des cellules ont

été collectés et le niveau d'expression d'HLA-A2 a été suivi en utilisant le mAb anti-HLA-A2 (MA2.1).

**Exemple 15 : Isolation de l'ARN et analyse Northern blot**

5

Les cellules ont été soit maintenues à 37° C ou ont subi un choc thermique à 42° C pendant 2 heures avant récupération par centrifugation. L'ARN total a été extrait par lyse au guanidinium isothocyanate et a été ultracentrifugé dans du chlorure de césium. Des  
10 échantillons d'ARN total (15 µg) ont été fractionnés dans un gel dénaturant contenant 1% d'agarose-formaldéhyde et ont été transférées sur membranes de nylon Hybond-N+ en respectant les instructions du fabricant (Amersham France S.A, les Ulis, France). Le Northern blot a été hybridé avec une sonde spécifique d'HSP70-2 (nucléotides 1955 à  
15 2159) et avec la sonde glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase (GAPDH). Toutes les sondes ont été marquées avec dCTP [<sup>32</sup>P] (3000 Ci mmol<sup>-1</sup>) en utilisant le Prime-IT™ II Random Primer labeling Kit (Stratagene). L'hybridation a été réalisée à 45° C pendant 16 heures avec la sonde d'HSP70-2 (10<sup>6</sup> cpm/ml) et la sonde GAPDH (10<sup>5</sup>  
20 cpm/ml). Les membranes ont été lavées deux fois avec 2 x SSC à température ambiante, une fois pendant 45 mn avec 2 x SSC/0.1 % SDS à 62° C et une fois à 62° C pendant 10 mn avec 0,1 x SSC, avant autoradiographie à 80° C pendant 11 jours.

25

30

## REFERENCES

- 5 Alexander J. P., Kudoh S., Melsop K. A., Hamilton T. A., Edinger M. G.,  
Tubbs R. R., Sica D., Tuason L., Klein E., Bukowski R. M., and Finke J.  
H. 1993. T-cells infiltrating renal cell carcinoma display a poor  
proliferative response even though they can produce interleukin 2 and  
express interleukin 2 receptors. *Cancer Res.* 53:1380.
- 10 Angevin E., Kremer F., Gaudin C., Hercend T., and Triebel F. 1997.  
Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization  
to type 1-like differentiation pattern, clonal T cell expansion and tumor-  
specific cytotoxicity. *Int. J. Cancer* 72:431.
- 15 Bernhard H., Karbach J., Wolfel T., Busch P., Storkel S., Stockle M.,  
Wolfel C., Seliger B., Huber C., Buschenfelde K. H.M.z., and Knuth A.  
1994. Cellular immune response to human renal-cell carcinomas :  
definition of a common antigen recognized by HLA-A2 restricted  
20 cytotoxic T-lymphocyte (CTL) clones. *International Journal of Cancer*  
59:837.
- Birnboim H. C., and Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure  
for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid. Res.* 7:1513.
- 25 Blachere N.E., Li Z., Chandawarkar R. Y., Suto R., Jaikaria N. S., Basu  
S., Udonio H., and Srivastava P. K. 1997. Heat shock protein-peptide  
complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T  
lymphocytes response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* 186:1315.

Brichard V., Pel A. V., Wölfel T., Wölfel C., Plaen E. D., Lethé B., Coulie P., and Boon T. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp Med.* 178:489.

5

Brouwenstijn N., Gaugler B., Kruse K.M., Spek C.W.V.d., Mulder A., Osanto S., Eynde B.J.V.d., and Schrier P.I. 1996. Renal-cell carcinoma-specific lysis by cytotoxic T-lymphocyte clones isolated from peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Inter. J. Cancer* 68:177.

10

Ennis P. D., Zemmour J., Salter R.D., and Parham P. 1990. Rapid cloning of HLA-A,B cDNA by using the polymerase chain reaction: Frequency and nature of errors produced in amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2833.

15

Even J., Lim A., Puisieux I., Ferradini L., Dietrich P. Y., Toubert A., Hercend T., Triebel F., Pannetier C., and Kourilsky P. 1995. T-cell repertoires in healthy and diseased human tissues analysed by T-cell receptor beta-chain CDR3 size determination : evidence for oligoclonal expansions in tumours and inflammatory diseases. *Research Immunology.* 146:65.

20

Farace F., Angevin E., Poullion I., Leboullaire C., Ferir G., Elias D., Escudier B., and Triebel F. 1997. T-cell receptor CDR3 size distribution analysis to evaluate specific T-cell response to cancer vaccines. *Inter. J. Cancer* 71:972.

25

Finke J. H., Zea A. H., Stanley J., Longo D. L., Mizoguchi H., Tubbs R.R., Wilttrout R. H., O'Shea J. J., Kudoh S., Klein E., Bukowski R. M., and Ochoa A. C. 1993. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in

30

T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Research*. 53:5613.

5 Gaugler B., Brouwenstijn N., Vantomme V., Szikora J. P., Spek C. W. V. d., Patard J. J., Boon T., Schrier P., and Eynde B. J. V. d. 1996. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics*. 44:323.

10 Genevee C., Diu A., Nierat J., Caignard A., Dietrich P. Y., Ferradini L., Roman-Roman S., Triebel F., and Hercend T. 1992. An experimentally validated panel of subsfamily-specific oligonucleotide primers (V $\alpha$ 1-w29/V $\beta$ 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol*. 22:1261.

15 Gruen J. R., and Weissman S. M. 1997. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood*. 90:4252.

20 Kumar A., Farace F., Gaudin C., and Triebel F. 1996. Clonal T cell expansion induced by interleukin-2 therapy in blood and tumors. *J. Clin. Invest*. 97:1219.

Milner C. M., and Campbell R. D.. 1990. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*. 32:242.

25 Milner C. M., and Campbell R. D. 1992. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*. 36:357.

30 Nestle F. O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G. et Schadendorf D.. 1998. Vaccination of melanoma patients with

peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine* 3  
328:332

5 Nijman H. W., Houbiers J. G., Vierboom M. P., Burg S. H. v. d.,  
Drijfhout J. W., D'Amato J., Kenemans P., Melief C. J., and Kast W. M.  
1993. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-  
A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 23(6):1215.

10 Pannetier C., Cochet M., Darche S., Casrouge A., Zoller M., and  
Kourilsky P. 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the  
murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined  
germ-line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2472.

15 Rosenberg S. A. 1992. The immunotherapy and gene therapy of cancer.  
*Journal of Clinical Oncology* 10:180.

20 Rosenberg S. A., Yang J. C., Schwartzentruber D. J., Hwu P., Marincola  
F. M., Topalian S. L., Restifo N. P., Dudley M. E., Schwartz S. L., Spiess  
P. J., Wunderlich J. R., Parkhurst M. R., Kawakami Y., Seipp C. A.  
Einhorn J. H. et D. E. White. 1998. Immunologic and therapeutic  
evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients  
with metastatic melanoma. *Nature Medicine* 3 321 :327

25 Salter R. D., Normont A. M., Chen B.P., Clayberger C., Kresky A.M.,  
Littman D. R., and Parham P. 1989. Polymorphism in the alpha3  
domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. *Nature* 338:345

30 Traversari C., Van der Bruggen P., Luescher I.F., Lurquin C., Chomez  
P., Van Pel A., De Plaen E., Amar-Costesec A., and Boon T. 1992. A  
nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1

by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. J. Exp. Med. 176:1453.

Vitiello A., Ishioka G., Grey H. M., Rose R., Farness P., LaFond R., Yuan  
5 L., Chisari F., V., Furze J., Bartholomeuz R., and Chesnut R. W.. 1995.  
Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic  
HBV infection. J. Clin. Invest. 95 341:349

10

15

20

25

30

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (IGR)

(B) RUE: 39 RUE CAMILLE DESMOULINS

(C) VILLE: 94805

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: VILLEJUIF CEDEX

(ii) TITRE DE L' INVENTION: COMPOSES PEPTIDIQUES D'HSP70

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 7

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 9 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Ser Leu Phe Glu Gly Ile Asp Ile Tyr  
1 5

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 10 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Ser Leu Phe Glu Gly Ile Asp Ile Tyr Thr  
1 5 10



## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 10 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Ser Leu Phe Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr  
 1                      5                      10

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGGCAAGCTT GGACTCAGAA TCTCCCCAGA CGCCGAG

37

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GCCCTCTAGA TCTCAGTCCC TCACAAGGCA GCTGTC

36

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: sonde HSP702A

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGGCAAGCTT AGTCTCAGAG CGGAGCCAAC

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iv) ANTI-SENS: OUI

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: sonde HSP70-2B

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GCCCTCTAGA GTCCCAACAG TCCACCTCAA

30

## REVENDICATIONS

1. Composé peptidique caractérisé en ce qu'il comporte au moins une  
5 séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'homologie avec les  
acides aminés entre les positions 286 et 294 d'HSP-70.
2. Composé peptidique selon la revendication 1 caractérisé en ce que  
l'acide aminé à la position 293 est de préférence l'isoleucine, la  
leucine, la valine, l'alanine, la glycine, ou la phénylalanine, plus  
10 particulièrement l'isoleucine.
3. Composé peptidique selon la revendication 1 qui a au moins la  
séquence SEQ ID n°1 ou SEQ ID n°2 ou SEQ ID n°3.
4. Composé peptidique selon l'une des revendications 1-3 caractérisé  
en ce qu'il comporte au moins un élément différent des acides  
15 aminés naturels.
5. Fragment d'ADN codant au moins pour un fragment peptidique de  
l'une des revendications 1 à 3.
6. Vecteur d'expression d'un fragment peptidique selon l'une des  
revendications 1 à 3 contenant le fragment d'ADN de la revendication  
20 5 fusionné à un promoteur fort et efficace dans les cellules  
eukaryotes, et/ou dans les cellules procaryotes, en particulier dans  
les cellules humaines.
7. Vecteur d'expression selon la revendication 6 comprenant en outre  
un ou des marqueurs de sélection et éventuellement une ou des  
25 séquences codantes pour des facteurs d'activation des défenses  
immunitaires, tels que des cytokines et/ou des lymphokines.
8. Vecteur selon l'une des revendications 6 et 7 caractérisé en ce qu'il  
s'agit d'un vecteur viral, d'un plasmide, ou d'un pseudo-vecteur.
9. Cellules dendritiques chargées en composés peptidiques selon l'une  
30 des revendications 1-4.
10. Cellules dendritiques transformées par le vecteur d'expression  
selon l'une des revendications 6 à 8.
11. Cellules dendritiques selon l'une des revendications 9 à 10  
caractérisées en ce qu'elles font parties des macrophages.

12. Composition pharmaceutique comprenant un composé peptidique ou un mélange de composés peptidiques selon l'une des revendications 1-4 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 5 13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un ou plusieurs adjuvants immunologiques, notamment des facteurs cytotoxiques des tumeurs.
- 10 14. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur d'expression selon l'une des revendications 6 et 8 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 15 15. Composition pharmaceutique comprenant notamment un fragment d'ADN selon la revendication 5 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 15 16. Composition pharmaceutique comprenant les cellules selon l'une des revendications 9 à 11 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 20 17. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 12 à 15 caractérisée en ce que le véhicule pharmaceutique est compatible avec une administration IV, subcutanée, orale, ou nasale.
- 25 18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce que le véhicule pharmaceutique est en outre un liposome, une nano-particule, ou une émulsion lipidiques, chargés positivement ou négativement.
- 30 19. Utilisation de la composition selon l'une des revendications 12 à 18 pour la fabrication d'un médicament.
20. Utilisation de la composition selon l'une des revendications 12 à 13 et 17 à 18 pour la fabrication d'un médicament destiné à une immunisation ex situ.
- 30 21. Utilisation de la composition selon l'une des revendications 14 à 18 pour la fabrication d'un médicament destiné à une immunisation in situ.
22. Utilisation de la composition selon l'une des revendications 12 à 18 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du

cancer, en particulier des tumeurs solides, notamment des carcinomes, des mélanomes, des neuroblastomes, des cancers du cou et de la tête, de préférence des carcinomes du rein.

23. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 12 à 18 pour stimuler les défenses immunitaires, en particulier pour augmenter la population des CTL des tumeurs et/ou induire la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques tels que par exemple IL-2, IF- $\gamma$  et TNF.
24. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 12 à 18 pour la fabrication d'un médicament destiné à stimuler les défenses immunitaires, en particulier pour augmenter la population des CTL des tumeurs et/ou induire la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques tels que par exemple IL-2, IF- $\gamma$  et TNF.
25. Procédé de production d'un anticorps qui se lie au mutant HSP70-2-293, en particulier au mutant HSP70-2 I-293, comprenant les étapes consistant à :
- a) Immuniser un mammifère avec un composé peptidique selon l'une des revendication 1 à 3,
  - b) Isoler un anticorps monoclonal qui se lie à HSP-70-2-293, particulièrement à HSP70-2 I-293, dans un essai immunologique.
26. Anticorps monoclonal qui se lie à HSP-70-2-293, particulièrement à HSP70-2 I-293.
27. Procédé de détection de la mutation d'HSP70-2-293, en particulier de la mutation HSP70-2 I-293, comprenant les étapes consistant à :
- a) Mettre en contact un échantillon prélevé chez un individu avec un anticorps monoclonal selon la revendication 26,
  - b) permettre la formation du complexe anticorps- HSP70-2-293,
  - c) détecter HSP70-2-293 au moyen d'un marqueur détectable dans le complexe ou qui se lie au complexe.
28. Trousse de diagnostic comportant notamment un anticorps selon la revendication 26 pour la détection du cancer.
29. Trousse de diagnostic comportant notamment un anticorps selon la revendication 26 pour le pronostique du cancer déclaré chez un individu.

30. Composition pharmaceutique comprenant notamment un anticorps monoclonal selon la revendication 26 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 5 31. Composition pharmaceutique selon la revendication 30 caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un ou plusieurs facteurs adjuvants immunologiques, notamment des agents cytotoxiques des tumeurs.
32. Utilisation de la composition pharmaceutique selon l'une des revendications 30 à 31 pour la fabrication d'un médicament.
- 10 33. Utilisation de la composition pharmaceutique selon l'une des revendications 30 à 31 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement du cancer, en particulier pour le traitement des tumeurs solides, notamment des carcinomes, des mélanomes, des neuroblastomes, des cancers du cou et de la tête, de préférence des
- 15 carcinomes du rein.

20  
**ORIGINAL**

CABINET REGIMBEAU  
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
26, Avenue Kléber  
75116 PARIS

25

30

génétique. La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression d'un fragment peptidique contenant un fragment d'ADN ci-dessus mentionné, fusionné à un promoteur fort et efficace dans les cellules eucaryotes, et/ou dans les cellules procaryotes, en particulier dans les cellules humaines. Le vecteur peut être viral, plasmidique, ou un pseudo-vecteur et peut comporter des marqueurs de sélection et exprimer des adjuvants immunologiques tels que des cytokines et/ou des lymphokines.

L'invention concerne également des cellules dendritiques chargées en composés peptidiques, et des cellules dendritiques transformées par le vecteur d'expression exprimant les fragments peptidiques. Ces cellules peuvent être aussi des macrophages. Nestle et al, (1998), décrit une méthode de vaccination qui consiste à charger les cellules dendritiques prises à un patient par des peptides antigéniques (en culture in vitro), et les injecter dans le système lymphatique de ce même patient. Cette publication est incorporée dans la description par référence.

Un autre aspect de l'invention porte sur une composition pharmaceutique, comprenant un composé peptidique mentionné ci-dessus ou un mélange desdits composés peptidiques et en option un ou plusieurs facteurs cytotoxiques des tumeurs (cytokines, lymphokines) par exemple IL-2, IF- $\gamma$  et TNF, et/ou et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Une composition pharmaceutique de l'invention peut comprendre ledit vecteur d'expression ou ledit fragment d'ADN mentionné supra et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

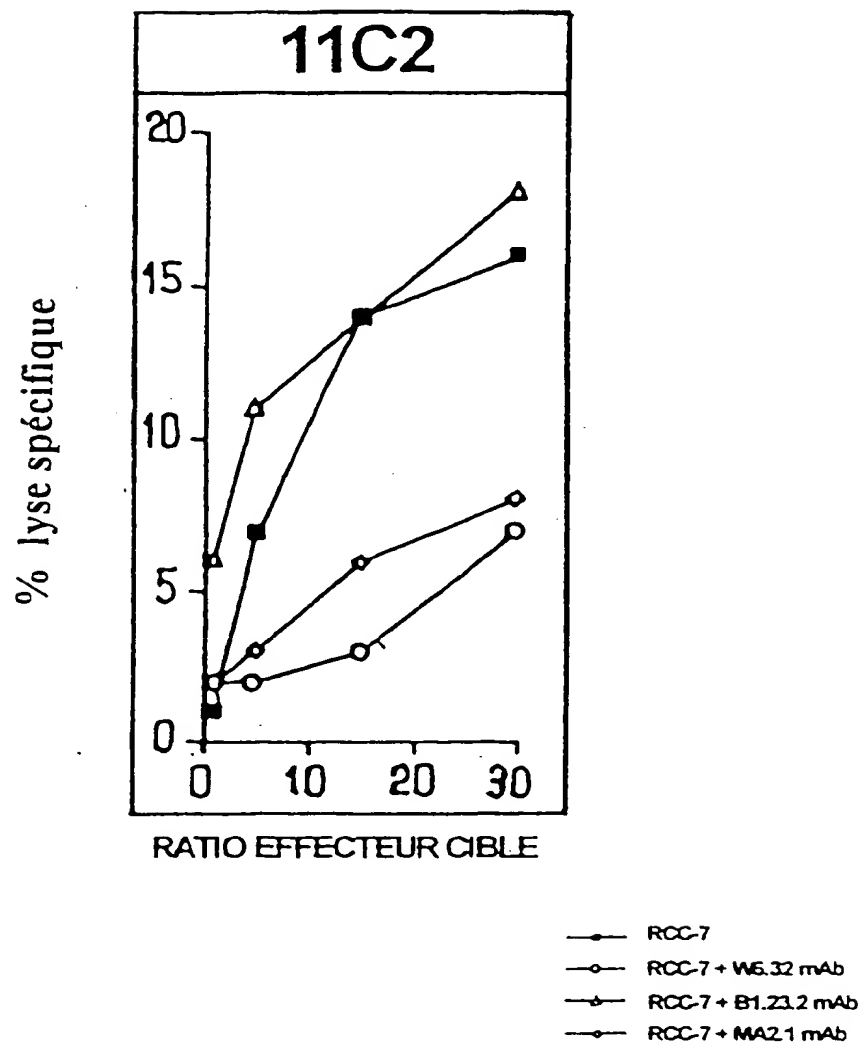
Le véhicule pharmaceutique peut être notamment un liposome, une nanoparticule, ou une émulsion lipidiques, chargés positivement ou négativement et être compatible avec une administration IV, subcutanée, orale ou nasale.

Un autre aspect de l'invention porte sur l'utilisation desdites compositions pour la fabrication d'un médicament. Ledit médicament est notamment destiné pour le traitement du cancer, en particulier des tumeurs solides, avantageusement des carcinomes, des mélanomes, des neuroblastomes, des cancers du cou et/ou de la tête, de préférence des carcinomes du rein. Plus spécifiquement, il est avantageux d'utiliser les composition comprenant un ou des composés peptidiques pour la fabrication d'un médicament destiné à une immunisation ex situ, et les

cancer, en particulier des tumeurs solides, notamment des carcinomes, des mélanomes, des neuroblastomes, des cancers du cou et de la tête, de préférence des carcinomes du rein.

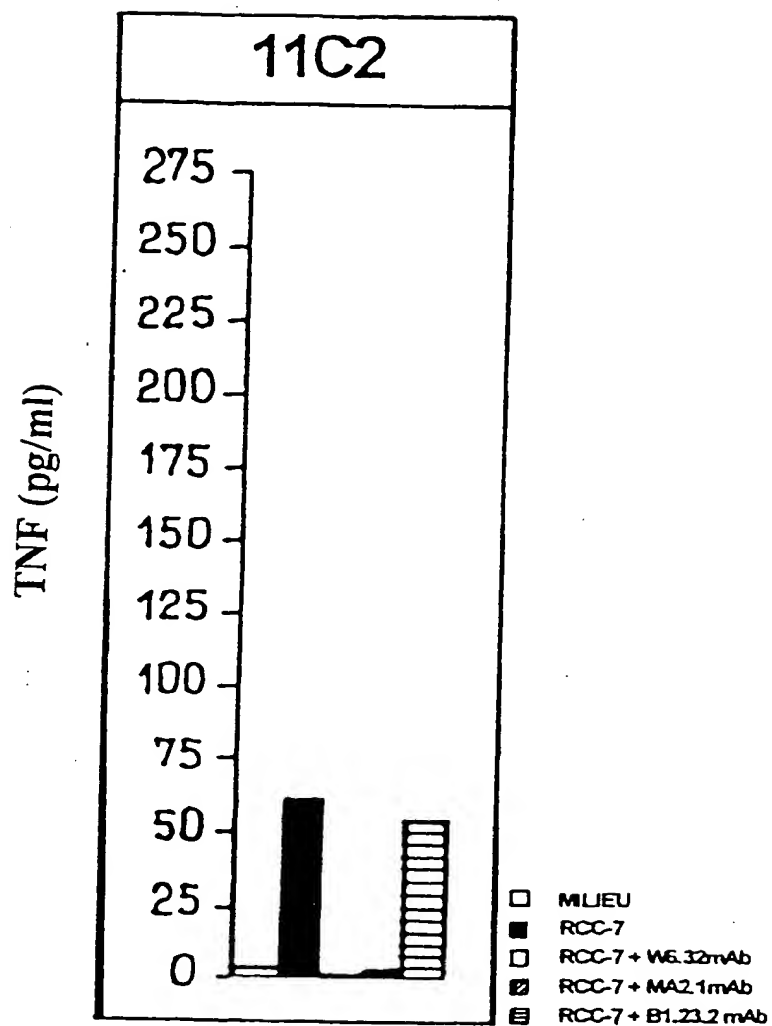
- 5 23. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 12 à 18 pour augmenter en milieu de culture la population des CTL des tumeurs et/ou induire la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques tels que par exemple IL-2, IF- $\gamma$  et TNF.
- 10 24. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 12 à 18 pour la fabrication d'un médicament destiné à stimuler les défenses immunitaires, en particulier pour augmenter la population des CTL des tumeurs et/ou induire la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques tels que par exemple IL-2, IF- $\gamma$  et TNF.
- 15 25. Procédé de production d'un anticorps qui se lie au mutant HSP70-2-293, en particulier au mutant HSP70-2 I-293, comprenant les étapes consistant à :
- a) Immuniser un mammifère avec un composé peptidique selon l'une des revendication 1 à 3,
  - b) Isoler un anticorps monoclonal qui se lie à HSP-70-2-293, particulièrement à HSP70-2 I-293, dans un essai immunologique.
- 20 26. Anticorps monoclonal qui se lie à HSP-70-2-293, particulièrement à HSP70-2 I-293.
27. Procédé de détection de la mutation d'HSP70-2-293, en particulier de la mutation HSP70-2 I-293, comprenant les étapes consistant à :
- a) Mettre en contact un échantillon prélevé chez un individu avec un anticorps monoclonal selon la revendication 26,
  - 25 b) permettre la formation du complexe anticorps- HSP70-2-293,
  - c) détecter HSP70-2-293 au moyen d'un marqueur détectable dans le complexe ou qui se lie au complexe.
28. Trousse de diagnostic comportant notamment un anticorps selon  
30 la revendication 26 pour la détection du cancer.
29. Trousse de diagnostic comportant notamment un anticorps selon la revendication 26 pour le pronostique du cancer déclaré chez un individu.





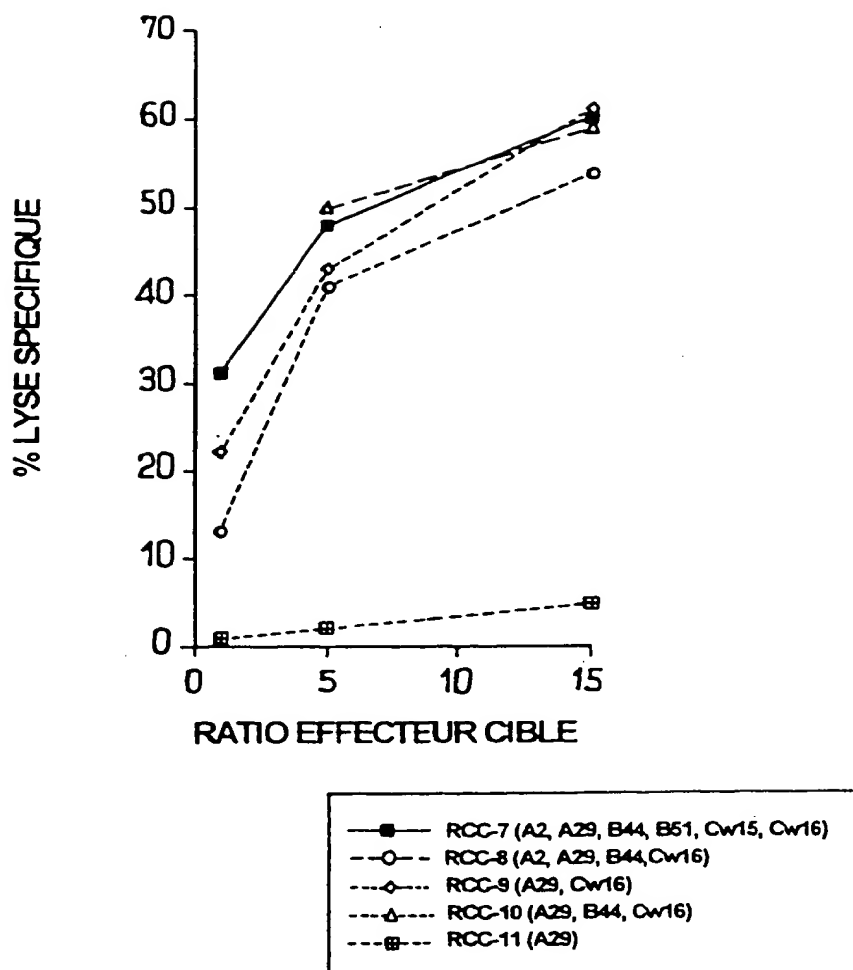
**Activité spécifique lytique du clone 11C2  
contre la lignée cellulaire autologue RCC-7**

**FIG.1**



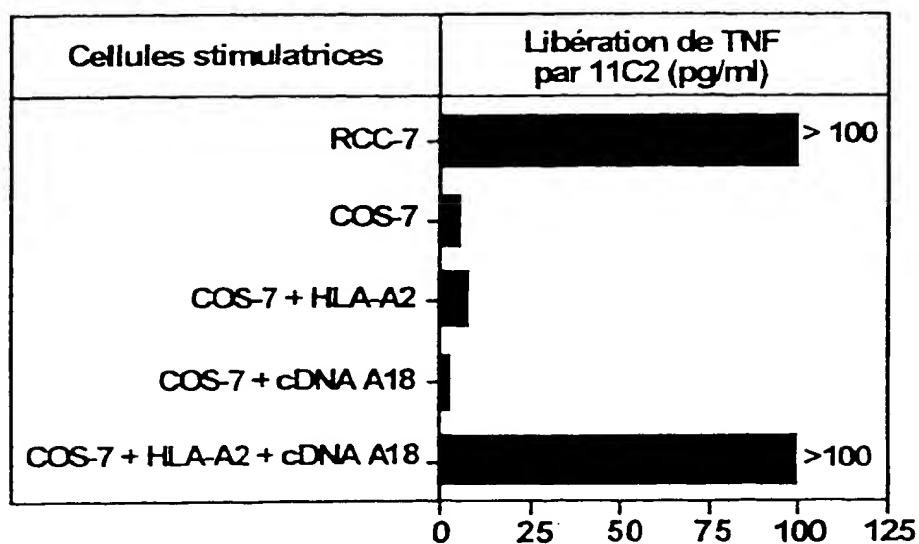
**Sécrétion de TNF par le clone CTL-11C2 lors de la stimulation  
avec la lignée cellulaire autologue RCC-7**

**FIG. 2**



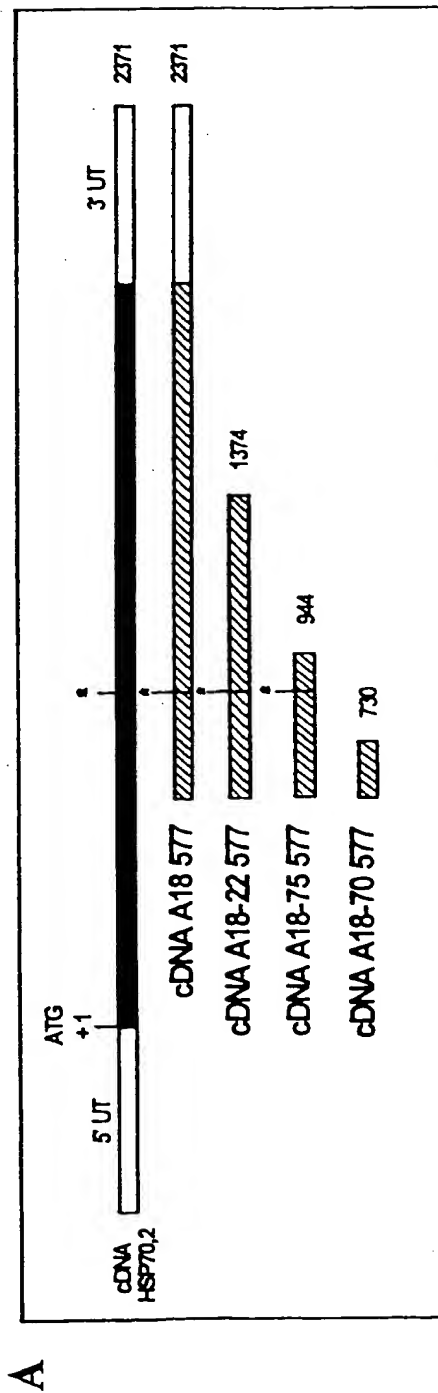
Cytotoxicité des CTL 11C2 sur de multiples  
lignées cellulaires allogéniques RCC

FIG. 3



**Stimulation du CTL 11C2 par les cellules  
co-transfectées temporairement avec  
l'ADNc HLA-A\*0201 autologue et l'ADNc A18**

FIG\_4

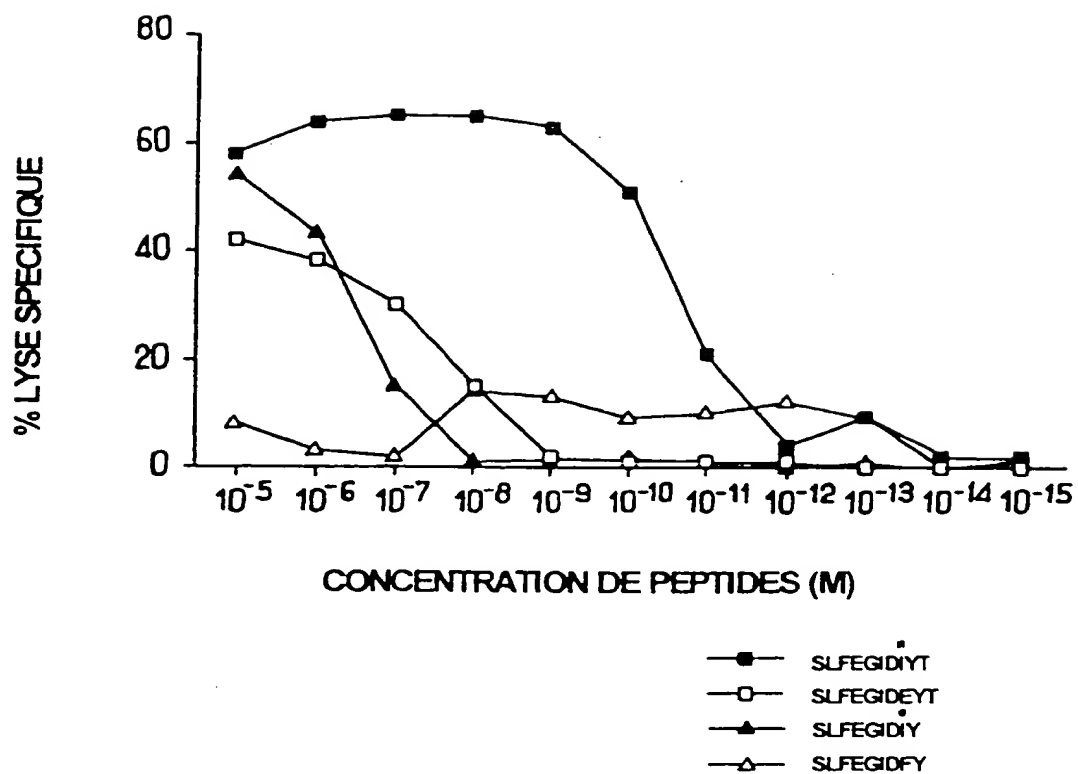


**B**

CELLULES STIMULATRICES	LIBERATION DE TNF PAR 11C2 (pg/ml)
COS-7	~10
COS-7+HLA A2	~10
COS-7+ cDNA A18	~10
COS-7+HLA A2+ cDNA A18	> 100
COS-7+HLA A2+ cDNA A18-22	> 100
COS-7+HLA A2+ cDNA A18-75	> 100
COS-7+HLA A2+ cDNA A18-70	~10

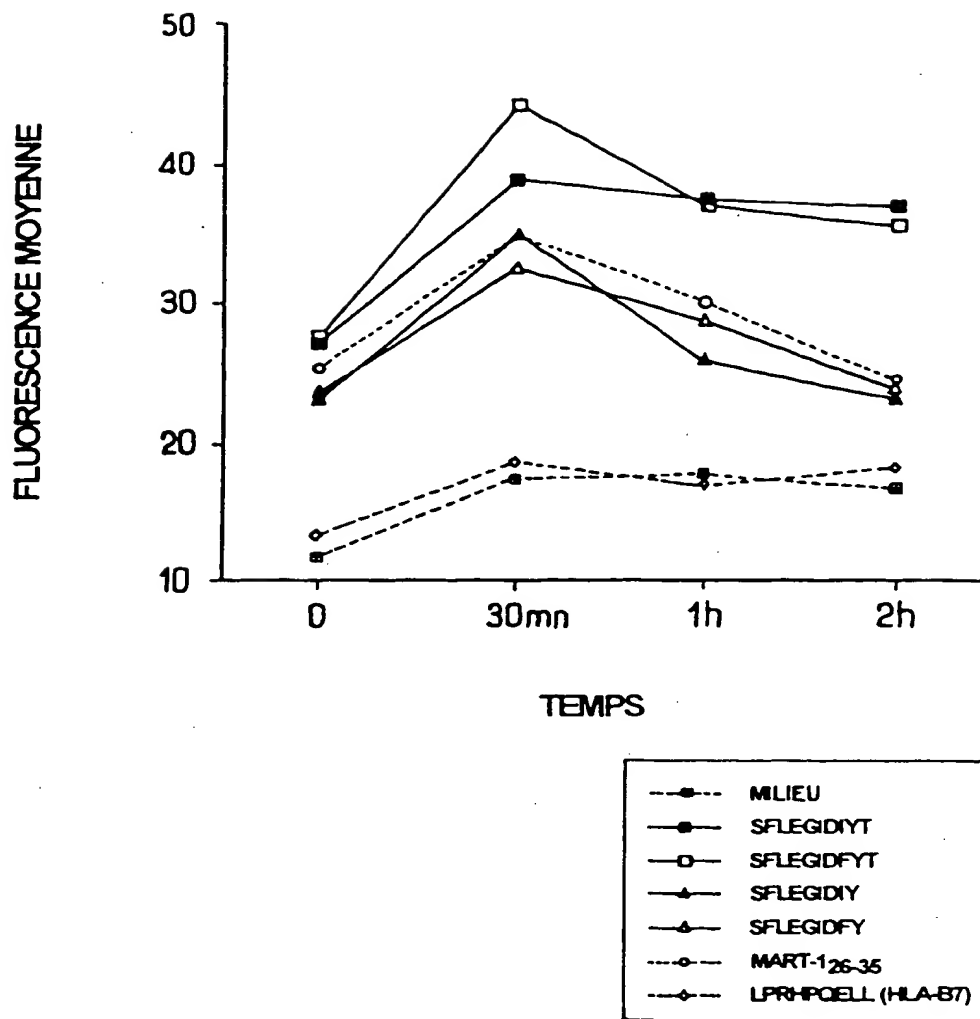
Localisation de la région épitopique d'HSP70 reconnue par le CTL 11C2

FIG.5



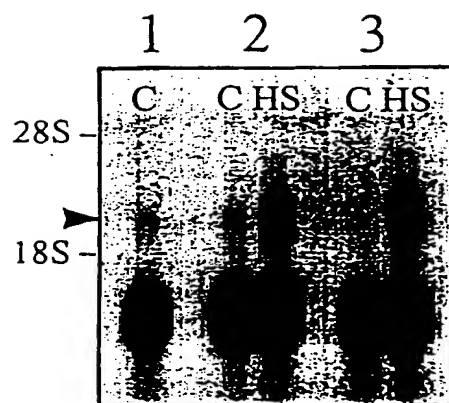
Lyse par CTL 11C2 de la lignée cellulaire autologue transformée par EBV et incubée avec les peptides codés par HSP70-2

FIG. 6



**Induction de l'expression d'HLA-A2 sur les cellules T2 par les peptides antigéniques d'HSP70-2**

FIG. 7



Analyse Northern Blot

FIG. 8